

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/56288 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. September 2000 (28.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP00/02409	D-15299 Müllrose (DE). SAMETI, Mohammad [IR/DE]; Erfurter Str. 38, D-66121 Saarbrücken (DE).
(22) Internationales Anmelddatum:	17. März 2000 (17.03.00)	(74) Anwalt: BARZ, Peter; Kaiserplatz 2, D-80803 München (DE).
(30) Prioritätsdaten:	199 12 502.3 19. März 1999 (19.03.99)	DE (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>):	INSTI-TUT FÜR NEUE MATERIALIEN GEM. GMBH [DE/DE]; Im Stadtwald, Gebäude 43, D-66123 Saarbrücken (DE). ACROSS BARRIERS GESELLSCHAFT FÜR NEUE TECHNOLOGIEN ZUR ABSORPTION UND APPLIKATION VON ARZNEISTOFFEN MBH [DE/DE]; Im Stadtwald, Gebäude 8.1, D-66123 Saarbrücken (DE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>):	SCHIESTEL, Thomas [DE/DE]; Uhlandstr. 12, D-66121 Saarbrücken (DE). SCHIRRA, Hermann [DE/DE]; Gräffstr. 28, D-66113 Saarbrücken (DE). SCHMIDT, Helmut [DE/DE]; Im Königsfeld 29, D-66130 Saarbrücken-Güdingen (DE). LEHR, Claus-Michael [DE/DE]; Franz-Schubert-Str. 7, D-66125 Saarbrücken-Dudweiler (DE). HALTNER, Eleonore [DE/DE]; Lessingstr. 52, D-66121 Saarbrücken (DE). KNEUER, Carsten [DE/DE]; Beeskower Str. 34,	

(54) Title: NANOPARTICLES, COMPLEXES WITH POLYNUCLEOTIDES AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: NANOSKALIGE TEILCHEN, KOMPLEXE MIT POLYNUKLEOTIDEN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to nanoparticles with a core of inorganic primary particles the surface of which is completely or partially covered by a coating by reacting them with organosilane or polyorganosilane that contains functional groups. The particles have a zeta potential of 0 to + 100 mV in a neutral pH range of 7.0 to 7.5. The nanoparticles form nanoparticle-polynucleotide complexes with polynucleotides (for example DNA). Said nanoparticle-polynucleotide complexes are used to transfect target cells or for gene therapy.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben werden nanoskalige Teilchen mit einem Kern aus anorganischen Primärpartikeln, deren Oberfläche durch Reaktion mit einem funktionelle Gruppen enthaltenden Organosilan oder Polyorganosiloxan vollständig oder teilweise mit einer Hülle belegt ist, wobei die Teilchen im neutralen pH-Bereich von 7,0 bis 7,5 ein Zeta-Potential von 0 bis + 100 mV aufweisen. Die nanoskaligen Teilchen bilden mit Polynukleotiden (z.B. DNA) Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe, die zur Transfektion von Targetzellen bzw. zur Gentherapie verwendet werden können.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

NANOSKALIGE TEILCHEN, KOMPLEXE MIT POLYNUKLEOTIDEN UND DEREN
VERWENDUNG

Die Erfindung betrifft nanoskalige Teilchen mit einem Kern aus anorganischen
5 Primärpartikeln, deren Oberfläche durch Reaktion mit einem funktionelle Gruppen
enthaltenden Organosilan oder Polyorganosiloxan vollständig oder teilweise mit
einer Hülle belegt ist. Ferner betrifft die Erfindung Komplexe dieser nanoskaligen
Teilchen mit Polynukleotiden, typischerweise DNA, sowie derartige Komplexe
enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen und die Verwendung der
10 nanoskaligen Teilchen bzw. deren Polynukleotid-Komplexe zur Transfektion von
Targetzellen bzw. in der Gentherapie.

Materialoberflächen reagieren bei Berührung mit Flüssigkeiten häufig durch einen
Ladungsaustausch. Dies ist besonders dann der Fall, wenn die Flüssigkeiten
15 prototyp und die Oberflächen polar sind, wie dies häufig bei anorganischen
Materialien wie z. B. Oxiden der Fall ist. Die Aufladung der Oberfläche wird als Zeta-
Potential bezeichnet. Bei kleinen Partikeln, z. B. Kolloiden, kann die Aufladung der
Oberfläche dazu führen, daß sich solche Partikel einander nicht mehr annähern und
damit stabilisiert werden. Diese Stabilisierung hängt von der Größe des Zeta-
20 Potentials (Ladung/Oberflächeneinheit) ab und kann sowohl positiv als auch negativ
sein. In prototypen Flüssigkeiten, bei denen ein pH-Wert definiert ist, läßt sich die
Aufladung durch den pH-Wert einstellen (Zeta-Potentialkurve). Weiterhin hängt die
Aufladung von der chemischen Natur der Oberfläche als Säure oder Base ab, die als
Funktion des pH-Wertes mehr oder weniger dissoziert sind und damit das Potential
25 bestimmen. Bei vorgegebenen Materialien (z. B. SiO₂, ZrO₂, TiO₂) sind das Zeta-
Potential und die Zeta-Potentialkurve eine feste Funktion der Chemie der
Partikeloberfläche und können nur über den pH-Wert in ihrer Größe verschoben
werden. Hinzu kommt, daß die Gesamt-Ionenkonzentration einer Lösung oder der
flüssigen Phase noch eine Rolle spielt. Diese kolloidchemischen Grundlagen sind
30 allgemein bekannt, und man weiß, daß über die geschilderten Prinzipien die
Oberflächenladung und das Zeta-Potential einstellen werden können. Da jedoch der
pH-Wert oft nicht frei wählbar ist, wäre eine Methode wünschenswert, die

unabhängig vom pH-Wert die Einstellung der Ladungsdichte der Oberfläche gestattet.

In der rekombinanten Gentechnologie und der Gentherapie werden Targetzellen

5 transfiziert, indem man die gewünschte DNA in die Zellen einschleust. Hierzu muß die DNA an einen Träger gebunden werden, der die DNA durch Ladungskompensation und Verringerung ihrer räumlichen Ausdehnung (DNA-Kondensation) in eine transportfähige Form bringt. Durch eine Funktionalisierung des Trägersystems mit geeigneten Liganden kann eine effiziente und spezifische Bindung an Targetzellen
10 mit einem anschließenden intrazellulären Transport in den Zellkern erreicht werden.

Aufgabe der Erfindung war es, nanoskalige Teilchen bereitzustellen, deren Oberflächenladungen und Oberflächenladungsdichten unabhängig vom pH und unab-

15 hängig von der Oberfläche eingestellt werden können. Dabei sollten Oberflächen-
ladungen im neutralen pH-Bereich (7,0-7,5) erzielt werden, die für physiologische Anwendungen erforderlich sind, so daß eine Verwendung als DNA-Trägersystem zur
Transfektion von Targetzellen ins Auge gefaßt werden konnte.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, Nanoteilchen-Polynukleotid-Komplexe bereit-
20 zustellen, die eine Stabilisierung von Polynukleotiden ermöglichen und in der rekombinanten Gentechnologie oder Gentherapie zur Transfektion von Targetzellen ge-
eignet sind.

Gegenstand der Erfindung sind nanoskalige Teilchen mit einem Kern aus anorgani-
25 schen Primärpartikeln, deren Oberfläche durch Reaktion mit einem funktionelle Gruppen enthaltenden Organosilan oder Polyorganosiloxan vollständig oder teil-
weise mit einer Hülle belegt ist, wobei die Teilchen im neutralen pH-Bereich von 7,0 bis 7,5 ein Zeta-Potential von 0 bis + 100 mV, vorzugsweise 0 bis 60 mV, aufweisen.
Gegenstand der Erfindung sind auch Suspensionen, die derartige Partikel in einem
30 wäßrigen, wäßrig-organischen oder organischen Lösungsmittelsystem suspendiert enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe, bei denen ein Polynukleotid (DNA, RNA, Oligonukleotide, Analoga) an ein derartiges nanoskaliges Teilchen gebunden ist.

- 5 Die Erfindung betrifft ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, die die genannten Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe neben pharmazeutisch verträglichen Träger- und/oder Hilfsstoffen enthalten, sowie die Verwendung der nanoskaligen Teilchen bzw. Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe zur stabilen Lagerung von Polynukleotiden und für den spezifischen oder unspezifischen Transfer genetischer Information in vorzugsweise eukaryontische Targetzellen (Transfektion). In diesem Rahmen eignen sich die nanoskaligen Teilchen und Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe z.B. zur lokalen, oralen oder systemischen Behandlung von Krankheiten und zum Einsatz in der Gentherapie.
- 10
- 15 Beispielsweise kann ein Gen für eine therapeutisch aktive Substanz, wie das Gen für das CFTR-Protein, den LDL-Rezeptor oder die Thymidinkinase, mit Hilfe der genannten Nanoteilchen in eine geschützte, biokompatible und aufnahmefähige Form überführt werden. Die Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe der Erfindung gestatten z.B. die gentherapeutische Behandlung entzündlicher Schleimhauterkrankungen, wenn man Antisense-Oligonukleotide zur Unterdrückung der Proliferation von Entzündungsmediatoren, z.B. Interleukinen, an die erfindungsgemäßen Nanoteilchen zum Zwecke der Stabilisierung und Vermittlung der zellulären Aufnahme bindet.
- 20
- 25 Die erfindungsgemäßen Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe lassen sich reproduzierbar herstellen und weisen eine geringe Polydispersität auf. Die an die Nanoteilchen gebundenen Polynukleotide sind sowohl vor physikalischer Beanspruchung als auch physiologischem (z.B. enzymatischem) Abbau geschützt. Es handelt sich somit um „sichere“ Systeme, die nicht die Risiken viraler
- 30 Trägersysteme in sich bergen und im Vergleich zu organischen Polymerträgern eine unerwartet niedrige Cytotoxizität zeigen.

Die erfindungsgemäßen nanoskaligen Teilchen weisen vorzugsweise eine Teilchengröße von 2 bis 150 nm, insbesondere 2 bis 100 nm, auf.

Die anorganischen Primärpartikel der erfindungsgemäßen nanoskaligen Teilchen
5 sind vorzugsweise ausgewählt aus Metalloxiden wie Magnetit (Fe_3O_4), Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), Mischoxiden der Formel $\text{Me(II)}\text{Fe}_2\text{O}_4$, in der Me(II) Zn, Cu, Co, Ni oder Mn
repräsentiert, Al_2O_3 (z.B. Boehmit), TiO_2 , ZrO_2 ; Nichtmetalloxiden wie SiO_2 ,
Calciumcarbonat, Calciumphosphaten wie Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat,
oder Borverbindungen wie Boroxid oder borhaltigen Metalllegierungen (z.B. Fe-B-
10 Legierungen). Weitere Beispiele für geeignete anorganische Primärpartikel sind z.B.
in den DE-A-195 12 427.8, DE-A-195 15 820.2 und DE-A-196 13 645.8
beschrieben. Dazu zählen unter anderem Oxide, Oxidhydrate, Sulfide, Selenide,
Telluride, Halogenide, Nitride, Carbide, Carbonitride, Boride, Silicide, Arsenide,
Antimonide, Phosphide, Carbonate, Carboxylate, Phosphate, Sulfate, Silikate,
15 Titanate, Zirkonate, Aluminate, Stannate, Plumbate und Mischoxide von Si, Al, B,
Zn, Cd, Ti, Zr, Ce, Sn, In, La, Fe, Pb, Cu, Ta, Nb, V, Mo, W, Alkali- oder
Erdalkalimetallen.

Die anorganischen Primärpartikel haben vorzugsweise eine Teilchengröße von 1 bis
20 150 nm, insbesondere 5 bis 100 nm. Die Hülle aus Organosilan oder Polyorgano-
siloxan hat je nach Belegung eine Schichtdicke ausgehend von z.B. 0,5 bis 1,5 nm
(Monolayer) bis zu vorzugsweise 50 nm, insbesondere bis zu 30 nm.

Die anorganischen Primärpartikel werden z.B. auf die in WO 97/38058 beschriebene
25 Weise ganz oder teilweise mit einer Hülle aus einem Organosilan oder Polyorgano-
siloxan mit funktionellen Gruppen versehen. Zu diesem Zweck geeignete
Ausgangssilane sind z.B. funktionelle Organosilane mit 1, 2 oder 3 hydrolysierbaren
Gruppen, z.B. Mono-, Di- oder Trialkoxysilane, deren Alkoxygruppen vorzugsweise
identisch sind und 1 bis 4 Kohlenstoffatome enthalten, entsprechende Chlorsilane und
Silazane. Die anderen an das Silicium gebundenen Gruppen sind Kohlen-
30 wasserstoffgruppen, z.B. Alkylgruppen, die vorzugsweise über 1 bis 20, besonders
bevorzugt 1 bis 10 und insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatome verfügen. Mindestens

eine dieser Kohlenwasserstoffgruppen ist hierbei eine aliphatische oder cycloaliphatische Gruppe, die durch eine oder mehrere Gruppen -O- und/oder -NR- (R = H oder C₁₋₄-Alkyl) unterbrochen sein kann und auch eine oder mehrere Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppel- oder -Dreifachbindungen umfassen kann. Diese Kohlenwasserstoffgruppe ist über eine Si-C-Bindung an das Siliciumatom geknüpft. Weiter muß diese Kohlenwasserstoffgruppe über mindestens eine Amino-, Carboxyl-, Epoxy-, Mercapto-, Cyano-, Isocyanato-, Hydroxy-, Vinyl- und/oder (Meth)acrylgruppe verfügen, wobei die Gruppen auch Derivate einschließen (z.B. Ester, Anhydrid und Säurehalogenid im Fall von Carboxyl und Mono- und Dialkylamino sowie Trialkylammonium im Fall von Amino).

5 Selbstverständlich können auch zwei oder mehr unterschiedliche funktionelle Gruppen an eine derartige Kohlenwasserstoffgruppe gebunden sein. Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Einsatz von Organosilanen mit mindestens einer Aminogruppe (im folgenden als Aminosilane bezeichnet). Konkrete Beispiele für derartige Aminosilane sind 3-Amino-propyltriethoxsilan, N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxsilan, Trimethoxysilyl-propyldiethylentriamin und N-(6-Aminohexyl)-3-aminopropyltrimethoxsilan.

10

15

Bei der Belegung der anorganischen Primärpartikel mit Organosilanen reagieren die hydrolysierbaren Gruppen und funktionellen Gruppen des Organosilans mit reaktiven Oberflächengruppen (z.B. Hydroxylgruppen) der Primärpartikel und bewirken eine feste Verankerung der Hülle. Im Falle der Belegung mit Polyorganosiloxanen erfolgt eine hydrolytische Polykondensation der Organosilane in Gegenwart der anorganischen Primärpartikel, wobei diese vollständig oder teilweise mit einer Polyorganosiloxan-Hülle beschichtet werden.

20

25 Die verwendeten Organosilane können gegebenenfalls vor der Belegung der Primärpartikel mit Derivatisierungsmitteln umgesetzt werden, um die vorhandenen funktionellen Gruppen zu derivatisieren. Bei diesen Derivatisierungsmitteln handelt es sich z.B. um polyfunktionelle Amine, beispielsweise Polyamine, die gegebenenfalls ganz oder teilweise alkyliert sind, wie Ethylendiamin und dessen Oligomere und Polymere, Ethylenimin und dessen Oligomere und Polymere, basische Aminosäuren oder Proteine, insbesondere Lysin, Arginin und deren Oligomere und Polymere, 2,4,6-Triaminopyrimidin oder Melamin.

30

In ähnlicher Weise können im Falle der Belegung der Primärpartikel mit Polyorganosiloxanen die erhaltenen nanoskaligen Teilchen mit Kern-Hüllen (Core-Shell)-Struktur gegebenenfalls mit Modifizierungsmitteln umgesetzt werden, um die funktionellen oder derivatisierten Gruppen des Polyorganosiloxans zu modifizieren.

5 Als derartige Modifizierungsmittel eignen sich die vorstehend genannten Derivatisierungsmittel.

Vorzugsweise werden die funktionellen Gruppen, Derivatisierungsmittel und Modifizierungsmittel (summarisch: „Oberflächenmodifikatoren“) so ausgewählt, daß
10 die nanoskaligen Teilchen eine positive Oberflächenladung aufweisen. Die oberflächenchemischen Eigenschaften der nanoskaligen Teilchen lassen sich durch die Art und Menge der Oberflächenmodifikatoren in einem weiten Bereich steuern. Beispielsweise lässt sich der isoelektrische Punkt (IEP) der Teilchen durch Variation des Verhältnisses von Partikel zu Oberflächenmodifikator im Bereich zwischen dem
15 IEP der unbeschichteten Partikel und dem IEP der vollständig beschichteten Partikel einstellen. Der IEP-Wert der vollständig beschichteten Partikel wird durch den pK-Wert der funktionellen Gruppen der Beschichtung festgelegt. Die Ladungsdichte und damit die Bindungskapazität für entgegengesetzt geladene Stoffe lässt sich in einem breiten pH-Bereich steuern, indem die zur Belegung der Primärpartikel verwendeten
20 Organosilane oder Polyorganosiloxane durch Wahl entsprechender Polyamine mit einer definierten Anzahl funktioneller Gruppen derivatisiert werden.

Im Falle von Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexen erschwert eine Reihe spezifischer Eigenschaften der Polynukleotide den Umgang mit diesen Substanzen. Dies
25 sind insbesondere auf die stark negative Ladung, die physikalische Instabilität, die enzymatische Instabilität und die räumliche Ausdehnung. Polynukleotide tragen unter physiologischen Bedingungen eine dem Polymerisationsgrad entsprechende Anzahl negativer Ladungen (Phosphatgruppen). Durch elektrostatische Abstoßung bewirken diese Ladungen eine Raumausdehnung der Polynukleotide, die für
30 Expressionsplasmide im Mikrometerbereich liegt. Bei einer mindestens 50 % igen Kompensation der negativen Ladungen können diese eine andere, dichtere Struktur mit geringerer räumlicher Ausdehnung annehmen. Im Falle der DNA kommt es dabei

zum Kollabieren der räumlichen Struktur, ein Vorgang, der nachfolgend als „DNA-Kondensation“ bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um einen hydrophoben Kollaps des interpolyelektrolytischen Komplexes zwischen der DNA und dem polykationischen Nanopartikel, wenn eine ausreichende Anzahl von negativen

5 Ladungen im DNA-Gerüst kompensiert worden ist.

Die DNA-Kondensation wird erfindungsgemäß mit positiv geladenen Nanopartikeln erreicht, wodurch die Polynukleotide physikalisch stabilisiert und gegen den Angriff von Enzymen (Nukleasen) geschützt sind. Durch gezielte Oberflächenmodifikation

10 der Nanopartikel lässt sich deren Zeta-Potential und damit die DNA-Bindungsstärke je nach Art und Oberflächenkonzentration (Oberflächendichte) des eingesetzten Aminosilans in einem weiten Bereich einstellen, und der isoelektrische Punkt der so hergestellten Nanopartikel kann entsprechend flexibel variiert werden. Ferner kann die Partikelgröße so optimiert werden, daß sich das Polynukleotid (z.B. DNA) ohne

15 Spannung um die Partikel winden lässt.

Die Oberflächenladungsdichte ist wie oben beschrieben in einem weiten pH-Bereich einstellbar und lässt sich für unterschiedliche Polynukleotide optimieren. Die Steuerung der Abstände der Ladungsträger über sogenannte Spacer (variable

20 (Cyclo)alkylketten zwischen der funktionellen Gruppe und dem Siliciumatom), führt zu einer optimalen Wechselwirkung des Polynukleotids mit den anorganischen Nanopartikeln.

Durch das Etablieren einer ausreichend großen Anzahl positiver Ladungen in den

25 richtigen Abständen können somit Polynukleotide wie DNA durch elektrostatische Wechselwirkung auf den Nanopartikeln fixiert werden (DNA-Kondensation).

Auch die Basizität lässt sich in einem weiten Bereich einstellen, was die Einstellung von Puffereigenschaften erlaubt. Diese haben unter Umständen einen starken

30 Einfluß auf das intrazelluläre Verhalten.

Weiterhin können an die funktionellen, derivatisierten oder modifizierten Gruppen andere Moleküle angekoppelt werden, welche z.B. eine Steuerung der biologischen Transportwege ermöglichen, z.B. Lektine, Transferrin, Folsäure, Vitamin B12 und Transportproteine. Auch kleine Moleküle, wie DNase-Inhibitoren, die auf spezifische

5 Signale hin freigesetzt werden, können angekoppelt werden.

Des Weiteren kann an die Teilchenoberfläche eine Hülle aus Oberflächenmodifikatoren (z.B. PEG) angekoppelt werden, mit der sich die Biozirkulation positiv beeinflussen lässt. Die Nanoteilchen können auch vollständig von einem liposomalen

10 System umschlossen sein.

Bei den erfindungsgemäßen Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexen handelt es sich um „sichere“ Transportsysteme, die nicht die Risiken viraler Transportsysteme (Gefahr der Mutagenität, Bildung replikationskompetenter Viren, unzuverlässige

15 Sicherheitstests) in sich bergen und im Vergleich zu organischen Polymerträgern eine unerwartet niedrige Cytotoxizität zeigen.

Das Gewichtsverhältnis Nanopartikel/Polynukleotid in den Komplexen kann z.B. 0,5:1 bis 500:1, vorzugsweise 1:1 bis 300:1 und insbesondere 30:1 bis 200:1,

20 betragen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

25 1. Partikelsynthese:

Zu einer Lösung von 8 g Tetraethoxysilan (TEOS) in 250 ml Ethanol werden 13 g NH₃ conc. gegeben. Es wird 16 h bei Raumtemperatur umgesetzt und anschließend durch Dialyse gereinigt. Es resultieren Suspensionen, in denen Partikel mit einem

30 mittleren Durchmesser von 80 nm und einem Zeta-Potential von -50 mV bei pH 7.4 vorliegen.

Durch Variation der Reaktionsparameter lassen sich die Partikeleigenschaften in einem weiten Bereich variieren.

2. Aminosilan-Modifizierung:

5

20 g einer kommerziell erhältlichen, 30 gew.-% Suspension von Silica-Partikeln in Isopropanol (IPAST, NISSAN Chemical Industries), 20 ml Wasser, 12 ml Eisessig und 6 g N-(6-Aminohexyl)-3-aminopropyltrimethoxysilan werden 16 h bei 80°C gerührt. Danach werden 25 ml Ethylenglycol zugesetzt und Wasser im Vakuum 10 entfernt. Anschließend wird die verbleibende Suspension durch Dialyse gereinigt. Die resultierenden oberflächenmodifizierten Partikel Si26H besitzen einen hydrodynamischen Durchmesser von 26 nm und ein Zeta-Potential von + 31 mV bei pH 7.4.

15 Diese Reaktion lässt sich allgemein zur Modifizierung von anorganischen Nanopartikeln mit Aminosilanen einsetzen.

3. Herstellung von Nanopartikel-DNA-Komplexen

20 Zur Herstellung der Nanopartikel-DNA-Komplexe genügt es in der Regel, beide Komponenten zu mischen. Die in 2) hergestellten Partikel werden in PBS aufgenommen und als 30facher Gewichtsüberschuß mit Plasmid-DNA (pCMV β) in PBS gemischt. Es resultieren DNA-Nanopartikel-Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 180 nm und einem Zeta-Potential von -50 mV 25 bei pH 7.4. Diese Nanopartikel-DNA-Komplexe können direkt zur Transfektion verwendet werden.

4. Durchführung der Transfektion:

30 Die Transfektion wurde in vitro mit Cos-1-Zellen untersucht. Diese wurden hierzu zuerst mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) und FCS (fetal calf serum) für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ in Luft inkubiert. Die Zellen wurden dann mit den

Nanopartikel-DNA-Komplexen versetzt und die Transfektion wurde über die Expression der β -Galactosidase bestimmt. Hierzu wurden die Zellen nach der Transfektion mit Triton-X lysiert und die Fluoreszenz bei 460 nm bestimmt. Die DNA konnte durch Verwendung der anorganischen Carriersysteme erfolgreich transfiziert werden.

5 5. Ankopplung von Lektinen:

1 ml einer 2 % Partikelsuspension der nach 1) hergestellten Partikel in PBS wird mit
10 100 μ l einer Avidin-Lösung der Konzentration 60 μ g/ml 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Zentrifugation wird nicht umgesetztes Avidin abgetrennt. Anschließend wird 1 ml einer 2 % Avidin-Partikelsuspension in PBS mit 75 μ l einer biotinylierten WGA-Lösung (Weizenlektin) der Konzentration 100 μ g/ml 1 h bei 37°C inkubiert. Es resultieren oberflächenmodifizierte Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 600 nm mit einem Gehalt von 2.8 μ g WGA pro mg Partikel.
15 Durch diese Oberflächenmodifizierung wird die Bindung an L-132 Zellen um den Faktor 4 verbessert, die Endocytose sogar um den Faktor 10.

Diese Reaktion lässt sich ganz allgemein zur Ankopplung biotinylierter Biomoleküle
20 an negativ geladene Nanopartikel oder Nanopartikel-DNA-Komplexe verwenden.

6. Zeta-Potential-Messungen:

Die Zeta-Potentiale wurden mit dem Zetasizer 4 der Fa. Malvern durch eine
25 Untersuchung der elektrophoretischen Mobilität bestimmt. Das Gerät wurde vor der Messung mit einem Latexstandard (- 55 mV) kalibriert.

Beispiel 2

Die Verfahrensschritte von Beispiel 1 werden wiederholt, jedoch verwendet man anstelle der oberflächenmodifizierten Nanopartikel Si26H die in der folgenden 5 Tabelle genannten Partikel Si10E, Si22E und Si100E. Es werden analoge Ergebnisse erzielt.

Tabelle

Partikel	mittl. Größe (nm)	IEP (pH)	ξ bei pH 7,4 (mV)	Spacer des Aminosilans
Si10E	10	8,1	+ 17	Ethyl
Si22E	22	8,6	+ 26	Ethyl
Si100E	100	7,7	+ 7	Ethyl
Si26H	26	8,6	+ 31	Hexyl

PATENTANSPRÜCHE

1. Nanoskalige Teilchen mit einem Kern aus anorganischen Primärpartikeln, deren Oberfläche durch Reaktion mit einem funktionelle Gruppen enthaltenden Organosilan oder Polyorganosiloxan vollständig oder teilweise mit einer Hülle belegt ist, wobei die Teilchen im neutralen pH-Bereich von 7,0 bis 7,5 ein Zeta-Potential von 0 bis + 100 mV aufweisen.
5
2. Nanoskalige Teilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die anorganischen Primärpartikel ausgewählt sind aus Metalloxiden wie Magnetit oder Maghemit, Nichtmetalloxiden wie SiO_2 , Calciumphosphaten oder Borverbindungen.
10
3. Nanoskalige Teilchen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Gruppen des Organosilans oder Polyorganosiloxans Aminogruppen sind.
15
4. Nanoskalige Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die verwendeten Organosilane mit Derivatisierungsmitteln derivatisiert worden sind.
20
5. Nanoskalige Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen oder derivatisierten Gruppen des Organosilans oder Polyorganosiloxans mit Modifizierungsmitteln umgesetzt worden sind.
25
6. Nanoskalige Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Gruppen, Derivatisierungsmittel und Modifizierungsmittel so ausgewählt worden sind, daß die Teilchen eine positive Oberflächenladung aufweisen.
30

7. Nanoskalige Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberflächenladungsdichte und Teilchengröße so eingestellt sind, daß in Anwesenheit von Polynukleotiden die Struktur der Polynukleotide kollabiert und die räumliche Ausdehnung des Polynukleotids verringert wird.
- 5
8. Verwendung der nanoskaligen Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur stabilen Lagerung von Polynukleotiden.
- 10 9. Verwendung der nanoskaligen Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 für den spezifischen oder unspezifischen Transfer genetischer Information in Targetzellen.
- 15 10. Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe, bei denen ein Polynukleotid an ein nanoskaliges Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 gebunden ist.
11. Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß über die funktionellen, derivatisierten oder modifizierten Gruppen des Organosilans oder Polyorganosiloxans Moleküle angekoppelt sind, welche eine Steuerung der biologischen Transportwege ermöglichen.
- 20 12. Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß auf die Komplexoberfläche Oberflächenmodifikatoren aufgebracht sind, welche die Biozirkulation beeinflussen.
- 25 13. Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie von einem liposomalen System umschlossen sind.
- 30 14. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens einen Nanopartikel-Polynukleotid-Komplex nach einem der Ansprüche 10 bis 13 und pharmazeutisch verträgliche Excipienten und/oder Hilfsstoffe.

15. Verwendung der Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe nach einem der Ansprüche 10 bis 13 zur lokalen, oralen oder systemischen Behandlung von Krankheiten.
- 5 16. Verwendung der Nanopartikel-Polynukleotid-Komplexe nach einem der Ansprüche 10 bis 13 zur Transfektion von Targetzellen bzw. zur Gentherapie.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 00/02409

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	IPC 7 A61K9/51	A61K47/48	C12N15/87	C12N15/88	A61K48/00
-------------------------------------	----------------	-----------	-----------	-----------	-----------

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, LIFESCIENCES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHIESTEL T, ET AL.: "Development of a flexible cell targeting system based on silica nanoparticles" MATERIALS RESEARCH SOCIETY SYMPOSIUM PROCEEDINGS, vol. 530, 1998, pages 65-71, XP000911914 ISSN: 0272-9172 page 66 page 67, last paragraph -page 68; figure 4 page 69 -page 71; figure 6	1-7
X	WO 97 38058 A (INST NEUE MAT GEMEIN GMBH ;LESNIAK CHRISTOPH (DE); NASS RUEDIGER () 16 October 1997 (1997-10-16) cited in the application page 13, line 22 -page 15, line 13 example claims	1-7

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 September 2000

Date of mailing of the international search report

11/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentdaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Epskamp, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 00/02409

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHRISEY LA, ET AL.: "Selective attachment of synthetic DNA to self-assembled-monolayer functionalized surfaces" MATERIALS RESEARCH SOCIETY SYMPOSIUM PROCEEDINGS, vol. 330, 1994, pages 179-184, XP000614716 ISSN: 0272-9172 page 179, paragraph 3 page 180, paragraph 2 page 180, last paragraph -page 182, paragraph 1; figures 1,2	1-3,10
P,X	SCHMIDT HK, ET AL.: "Organic-inorganic hybrid materials processing and applications" MATERIALS RESEARCH SOCIETY SYMPOSIUM PROCEEDINGS, vol. 576, 5 April 1999 (1999-04-05), pages 395-407, XP000897942 ISSN: 0272-9172 page 397, paragraph 2 -page 399, paragraph 1; figures 2-4	1-12, 14-16
P,X	KNEUER C, ET AL.: "Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (SPECIAL ISSUE ON "COLLOIDAL DRUG CARRIERS", JUNE 3-5TH 1999), vol. 196, 10 March 2000 (2000-03-10), pages 257-261, XP000900562 ISSN: 0378-5173 page 258, left-hand column, paragraph 1 -right-hand column, paragraph 1; figure 1; table 1 page 260, left-hand column, last paragraph -right-hand column	1-3, 6-10, 14-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No.

PCT/EP 00/02409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9738058 A	16-10-1997	DE 19614136 A	16-10-1997
		AT 194374 T	15-07-2000
		AU 2637597 A	29-10-1997
		CA 2249609 A	16-10-1997
		CN 1214716 A	21-04-1999
		DE 59701970 D	10-08-2000
		EP 0892834 A	27-01-1999
		JP 2000509005 T	18-07-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02409

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	IPK 7 A61K9/51 A61K47/48 C12N15/87 C12N15/88 A61K48/00
----------------------------------------------	--------------------------------------------------------

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 7 A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, LIFESCIENCES

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>SCHIESTEL T, ET AL.: "Development of a flexible cell targeting system based on silica nanoparticles" MATERIALS RESEARCH SOCIETY SYMPOSIUM PROCEEDINGS, Bd. 530, 1998, Seiten 65-71, XP000911914 ISSN: 0272-9172 Seite 66 Seite 67, letzter Absatz -Seite 68; Abbildung 4 Seite 69 -Seite 71; Abbildung 6</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-7

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Ablaufdatum des Internationalen Recherchenberichts

4. September 2000

11/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Epskamp, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/02409

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 38058 A (INST NEUE MAT GEMEIN GMBH ;LESNIAK CHRISTOPH (DE); NASS RUEDIGER () 16. Oktober 1997 (1997-10-16) in der Anmeldung erwähnt Seite 13, Zeile 22 -Seite 15, Zeile 13 Beispiel Ansprüche	1-7
A	CHRISEY LA, ET AL.: "Selective attachment of synthetic DNA to self-assembled-monolayer functionalized surfaces" MATERIALS RESEARCH SOCIETY SYMPOSIUM PROCEEDINGS, Bd. 330, 1994, Seiten 179-184, XP000614716 ISSN: 0272-9172 Seite 179, Absatz 3 Seite 180, Absatz 2 Seite 180, letzter Absatz -Seite 182, Absatz 1; Abbildungen 1,2	1-3, 10
P, X	SCHMIDT HK, ET AL.: "Organic-inorganic hybrid materials processing and applications" MATERIALS RESEARCH SOCIETY SYMPOSIUM PROCEEDINGS, Bd. 576, 5. April 1999 (1999-04-05), Seiten 395-407, XP000897942 ISSN: 0272-9172 Seite 397, Absatz 2 -Seite 399, Absatz 1; Abbildungen 2-4	1-12, 14-16
P, X	KNEUER C, ET AL.: "Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (SPECIAL ISSUE ON "COLLOIDAL DRUG CARRIERS", JUNE 3-5TH 1999), Bd. 196, 10. März 2000 (2000-03-10), Seiten 257-261, XP000900562 ISSN: 0378-5173 Seite 258, linke Spalte, Absatz 1 -rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 1; Tabelle 1 Seite 260, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte	1-3, 6-10, 14-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02409

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9738058	A	16-10-1997	DE 19614136 A	16-10-1997
			AT 194374 T	15-07-2000
			AU 2637597 A	29-10-1997
			CA 2249609 A	16-10-1997
			CN 1214716 A	21-04-1999
			DE 59701970 D	10-08-2000
			EP 0892834 A	27-01-1999
			JP 2000509005 T	18-07-2000